

Aus dem Robert Koch - Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. Hansjürgen Raettig

DIE SCHUTZWIRKUNG VON ORAL GEGEBENEN BAKTERIENFRAKTIONEN IM TIERVERSUCH

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Elke Birnschein
aus Berlin

1971

Aus dem Robert Koch - Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. Hansjürgen Raettig

DIE SCHUTZWIRKUNG VON ORAL GEGEBENEN BAKTERIENFRAKTIONEN IM TIERVERSUCH

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Elke Birnschein

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. H. Raettig

Korreferent: Prof. Dr. K. Großgebauer



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Fromoviert am: 11. 6. 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden der Versuche zur oralen Immunisierung	2
Ergebnisse der Versuche zur oralen Immunisierung	6
Diskussion	20
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	28

Die Arbeit enthält 4 Abbildungen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548809_0110

Einleitung

Es ist schon lange bekannt, daß viele gram-negative Bakterien eine Reihe von Veränderungen hervorrufen, wenn sie in einen Makroorganismus eindringen, wie zum Beispiel Änderung der spezifischen Infektabwehr, Fieber, Leukopenien, Leukozytosen und anderes.

In den 30er Jahren beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen, darunter auch die von BOIVIN, mit der Reindarstellung von Bakterienzellwänden und ihrer chemischen Zusammensetzung. Sie waren aber hauptsächlich an den somatischen Antigenen interessiert (24).

WESTPHAL und LÜDERITZ untersuchten ebenfalls den Aufbau der Endotoxine gram-negativer Keime und konnten zeigen, daß die Komponenten aus einer Polysaccharid-Nucleinsäure-Fraktion einerseits und Protein und Lipid andererseits bestehen. Im Rahmen ihrer Versuche über die pyrogenen Eigenschaften der Endotoxine stellten sie fest, daß das Polysaccharid chemisch ein Lipopolysaccharid darstellt (38, 39).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Fraktion nach oraler Immunisierung die spezifische Infektabwehr steigert.

Material und Methoden der Versuche zur oralen
Immunisierung

1. Versuchstiere

Für die Immunisierung wurden NMRI-Mäuse verwendet, die am Anfang der Versuche ein durchschnittliches Gewicht von 16 - 20 g hatten. Während der Versuche blieben die Mäuse zu je 20 - 25 Tieren in Plastikkäfigen. Sie bekamen Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser ad libitum. Die Kontrollmäuse wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten.

2. Impfstoff

A. Bereitung der Bakterienfraktionen

3 Stämme von *S. typhi murium* (Breslau I, II, III) wurden auf Sauton-Nährboden⁺ geimpft. Für jeden Ansatz benötigte man etwa 300 ml Sauton-Agar. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C wurde die Bakterienkultur mit 0,85%iger NaCl-Lösung abgeschwemmt und eine Stunde lang zentrifugiert. Das Bakterien-Sediment wurde mit Aqua destillata gewaschen, noch einmal zentrifugiert und im Exsiccator getrocknet. Von 10 l Sauton-Agar wurden etwa 10 - 15 g Trockensubstanz gewonnen.

⁺Bestandteile des Sauton-Nährbodens: 40 g Asparagin, 20 g Zitronensäure, 5 g Magnesiumsulfat, 5 g Kaliumhydrogenphosphat, 500 mg Ammoniumeisen(III)citrat, 500 ml Glycerin, 20 ml Ammoniak, einige Tropfen n/10 Natronlauge bis zur Einstellung eines pH-Wertes von 7,5, 2% Agar.

1. Bereitung der Lipide

Etwa 10 g Trockensubstanz der Bakterien wurde mit 100 ml Aceton versetzt, drei Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgehoben und zum Sediment wieder 100 ml Aceton zugefügt. Diese Suspension wurde nach einem 6stündigen Aufenthalt bei 50° C abermals zentrifugiert. Der 2. Überstand wurde mit dem ersten vermischt. Der Bakterien-Rückstand blieb nach Zugabe von 75 ml Äthylalkohol und 75 ml Äther 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann wiederum zentrifugiert. Das Sediment wurde im Exsiccator getrocknet und alle Überstände vereinigt, die die Lipide enthielten und eingedampft. Ausbeute: etwa 5% (500 mg).

Die weitere Extraktion der Bakterien erfolgte nach dem Phenol/Wasser-Verfahren von WESTPHAL, LÜDERITZ und BISTER (37).

2. Bereitung der Ribonucleinsäure (RNS)

10 g getrocknete Bakterien wurden in 350 ml Wasser suspendiert und unter Zugabe von 350 ml 90%iger Phenollösung 30 Minuten lang bei 65 - 68° C gerührt. Anschließend wurde auf 5 - 10° C abgekühlt und zentrifugiert (3500 U/Minute). Man erhielt zwei Phasen, eine obere wäßrige und eine untere Phenolschicht. Nach dem Zentrifugieren entnahm man die wäßrige Schicht mit einer Spritze. Die Phenolschicht wurde noch einmal mit 300 ml Wasser gerührt, erneut abgekühlt und zentrifugiert. Dann wurde die Phenolschicht abgetrennt und bis zur Proteinherstellung

aufbewahrt. Die wäßrigen Lösungen, die Nucleinsäuren und Lipopolysaccharide enthielten, wurden vereinigt und solange gegen Wasser dialysiert, bis kein Phenol mehr nachweisbar war. Aus dem Dialysat wurde nach dem Einengen im Vacuum (etwa 100 ml) durch Zugabe von 600 ml Äthanol unter Zusatz von 4 g Natriumacetat die RNS ausgefällt und nach dem Waschen mit 70%igem Äthanol im Exsiccator getrocknet. Unter Zusatz von wenig n/10 Natronlauge wurde anschließend eine 3%ige wäßrige Lösung von RNS hergestellt, die 4 Stunden lang bei 40 000 U/Minute zentrifugiert wurde. Bei dieser Prozedur schied sich das LPS als feines, durchsichtiges Lipopolysaccharid-Sediment ab. Der Überstand wurde mit n/10 Salzsäure bei 5° C und pH 1,3 gefällt, und der dabei auftretende Niederschlag, der die RNS enthielt, wurde dreimal mit 50%igem Alkohol gewaschen und anschließend getrocknet. Durch weitere Wiederholungen dieser alkoholischen Fraktionierung, wie sie GOEBEL, BINKLEY und PERLMAN angeben, konnten die Substanzen weiter gereinigt werden (11).

Ausbeute: etwa 1% der trockenen Bakterien (100 mg).

Die Reinheitsprüfung der RNS erfolgte durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm im Spektrophotometer (Zeiss) und durch die Orcinbestimmung im "Elko" (Zeiss) nach MEJBAUM (23). Beide Methoden zeigten einen RNS-Gehalt von nahezu 100% an.

3. Bereitung der Lipopolysaccharide (LPS)

Aus den gesammelten Sedimenten (siehe oben) wurde eine 3%ige wäßrige Lösung mit wenigen Tropfen n/10 Natronlauge herge-

stellt und das Ungelöste abzentrifugiert (40 000 U/Minute, 4 Stunden). Die Methode des Zentrifugierens wurde solange wiederholt, bis keine RNS mehr nachweisbar war. Die Reinheitsprüfung erfolgte auf spektrophotometrischem Wege.

Ausbeute: etwa 1,5% (150 mg).

4. Bereitung der Proteine

Die Phenolschicht wurde mit 150 ml Wasser geschüttelt, abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich im Scheidetrichter das Wasser abgetrennt. Sie enthielt die Proteine, welche nach Zusatz von 6 ml einer gesättigten methanolischen Natriumacetatlösung und 400 ml Methanol ausfielen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit Methanol und Aceton und viermal mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Ausbeute: etwa 3% (300 mg).

B. Herstellung des Vollantigens

Ein Teil der Versuchstiere wurde mit dem Vollantigen von *S. typhi murium* immunisiert. Für die Impfstoffherstellung wurde die Bakterienkultur 24 Stunden lang bei 37° C bebrütet und anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung (pH 7,2) von den Agarschalen abgeschwemmt. Der Titer des Impfstoffes wurde auf 1×10^9 eingestellt, und die Inaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 100° C für 3 Minuten.

3. Immunisierungsart

Die Mäuse wurden zu jedem Versuch in 6 gleiche Gruppen aufgeteilt.

- Gruppe 1: Orale Impfung mit 0,25 ml des S.typhi murium-Vollantigens,
- Gruppe 2: Orale Impfung mit 0,2 mg RNS gelöst in 0,25 ml NaCl-Lösung (0,85%ig),
- Gruppe 3: Orale Impfung mit 0,2 mg LPS gelöst in 0,25 ml NaCl-Lösung (0,85%ig),
- Gruppe 4: Orale Impfung mit 0,2 mg Lipid gelöst in 0,25 ml NaCl-Lösung (0,85%ig),
- Gruppe 5: Orale Impfung mit 0,2 mg Protein gelöst in 0,25 ml NaCl-Lösung (0,85%ig),
- Gruppe 6: Kontrolltiere - keine Impfung.
- Die Dauer der Behandlung betrug 10 Tage.

4. Infektion der Mäuse

Jede immunisierte Maus und jede Kontrollmaus wurde am 10. Tage nach der letzten oralen Immunisierung mit 0,25 ml des virulenten S.typhi murium-Stammes infiziert und zwar auf oralem Wege. Die Infektionsdosis wurde auf 10^9 Keime/ml eingestellt.

Ergebnisse

der Versuche zur oralen Immunisierung

In 6 Versuchen mit einem Tierkollektiv von 1763 Mäusen prüfte ich die spezifische Schutzwirkung von Bakterienfraktionen aus S.typhi murium. Der Erfolg der oralen Immunisierung wurde am Vergleich der Todesfälle gemessen, die bei den immunisierten Mäusen und den Kontrolltieren während eines Zeitraumes von

25 Tagen nach der Infektion auftraten. Insgesamt wurden 1469 Tiere spezifisch oral geimpft und anschließend infiziert. 294 Mäuse dienten in den Versuchen als Kontrolle.

1. Orale Impfung mit S.typhi murium-Vollantigen

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der 1. und 6. Versuchsgruppe. In jedem der 6 Einzelversuche liegt die Endmortalität bei den geimpften Mäusen niedriger als bei den ungeimpften. Der beste Immunisierungserfolg wurde in Versuch Nr. 4 erzielt.

Tabelle 1

Die Daten für die Versuche mit spezifischer, oraler Immunisierung durch S.typhi murium-Vollantigen und oraler Infektionsbelastung mit dem homologen Stamm.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen		
	n	abs.	davon gestorben %	n	abs.	davon gestorben %
1	2	3	4	5	6	7
1	50	10	20,0	50	18	34,0
2	50	14	28,0	50	34	68,0
3	50	23	46,0	50	32	64,0
4	50	10	20,0	47	34	75,1
5	49	15	30,6	50	33	66,0
6	48	24	49,9	47	39	82,9
Summe	297	96	32,4	294	190	65,0

n = Zahl der Tiere

% = Endmortalität in %

Die Mortalität konnte um 55,1% gesenkt werden. Versuch Nr. 5 zeigt einen mittelguten Impfschutz. 30,6% der Immuntiere und 66,0% der Kontrollen überlebten die Infektion nicht. Am schlechtesten schnitt Versuch Nr. 6 ab, in dem die Mortalität am höchsten lag: 49,9% der immunisierten Mäuse starben und von den nichtimmunisierten Tieren 82,9%. Bei der Zusammenfassung aller 6 Versuche ergab sich eine Endmortalität von 32,4% bei den Immuntieren gegenüber 65,0% bei den Kontrollen. Der Vierfelder- χ^2 -Test zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,05\%$). Der Vergleich dieser beiden versuchsgruppen ist aus der Vierfeldertafel in Tabelle 2 zu ersehen.

Tabelle 2
Vierfeldertafel.

	Gestorben	Infektion überstanden	Insgesamt
Mit S.typhi murium immunisiert	96	201	297
Kontrolle	190	104	294
Insgesamt	286	305	591

Dieser Versuch diente als positive (immunisierte Tiere) und negative (nichtimmunisierte Tiere) Kontrolle für die folgenden Versuchsgruppen. In allen Abbildungen werden deshalb 3 gleichzeitige Ansätze verglichen: die Impfung mit dem Voll-

antigen, die Impfung mit einer Bakterienfraktion und die nichtgeimpfte Kontrolle. In den Tabellen stellte ich nur die mit Bakterienfraktionen immunisierten Mäuse den negativen Kontrollen gegenüber.

Die Versuchsergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 1 - 4 dargestellt. Die statistische Sicherung der Endmortalität mit Hilfe des Vierfelder- χ^2 -Testes ist jeweils im Anschluß an die Beschreibung der einzelnen Versuchsgruppen aufgeführt. Die Tabellen 2, 4, 6, 8 und 10 zeigen die Vierfeldertafeln (35).

2. Orale Impfung mit RNS aus S. typhi murium-Bakterien

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der 2. Versuchsgruppe dargestellt. Die Endmortalität liegt bei den mit RNS immunisierten Tieren in jedem der einzelnen Versuche niedriger als bei den Kontrollen. Im 1. Versuch starben von 50 geimpften Mäusen nur 14,0%, bei der gleichen Anzahl von Kontrolltieren dagegen 34,0%. Auffallend ist, daß in den übrigen Versuchen die Mortalität allgemein zunahm. Während sie in Versuch Nr. 4 noch 52,0% bei den Immuntieren und 75,1% bei den Kontrollen betrug, war in Versuch Nr. 6 ein Anstieg auf 57,1% bei den geimpften und 82,9% bei den ungeimpften Mäusen zu verzeichnen.

Die Zusammenfassung dieser 6 Versuche ist in Abbildung 1 dargestellt. Es handelt sich um ein Tierkollektiv von 287 oral mit RNS immunisierten Mäusen und 294 Kontrollmäusen. In den ersten 4 Tagen sind nur geringe Unterschiede in der Mortalität zu verzeichnen. Zwischen dem 4. und 11. Tage bilden sich

steil ansteigende Absterbekurven aus sowohl bei den geimpften als auch bei den ungeimpften Tieren. Danach zeigt die Kurve der mit RNS immunisierten Mäuse nur noch einen geringen Anstieg. Am 25. Tage post infectionem beträgt die Endmortalität bei ihnen 48,9%, bei den Kontrollen 65,0%.

Tabelle 3

Die Daten für die Versuche mit spezifischer, oraler Immunisierung durch RNS und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S.typhi murium*-Bakterien.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen		
	n	davon gestorben		n	davon gestorben	
		abs.	%		abs.	%
1	2	3	4	5	6	7
1	50	7	14,0	50	18	34,0
2	49	28	56,0	50	34	68,0
3	45	27	60,3	50	32	64,0
4	48	25	52,0	47	34	75,1
5	46	25	54,2	50	33	66,0
6	49	28	57,1	47	39	82,9
Summe	287	140	48,9	294	190	65,0

Dieses Ergebnis sicherte ich statistisch mit Hilfe des χ^2 -Testes. Tabelle 4 zeigt die Vierfeldertafel, in der die Immunisierten den Kontrollen gegenübergestellt sind. In der Berechnung der Mortalität beider Gruppen stellte ich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05% einen hochsignifikanten

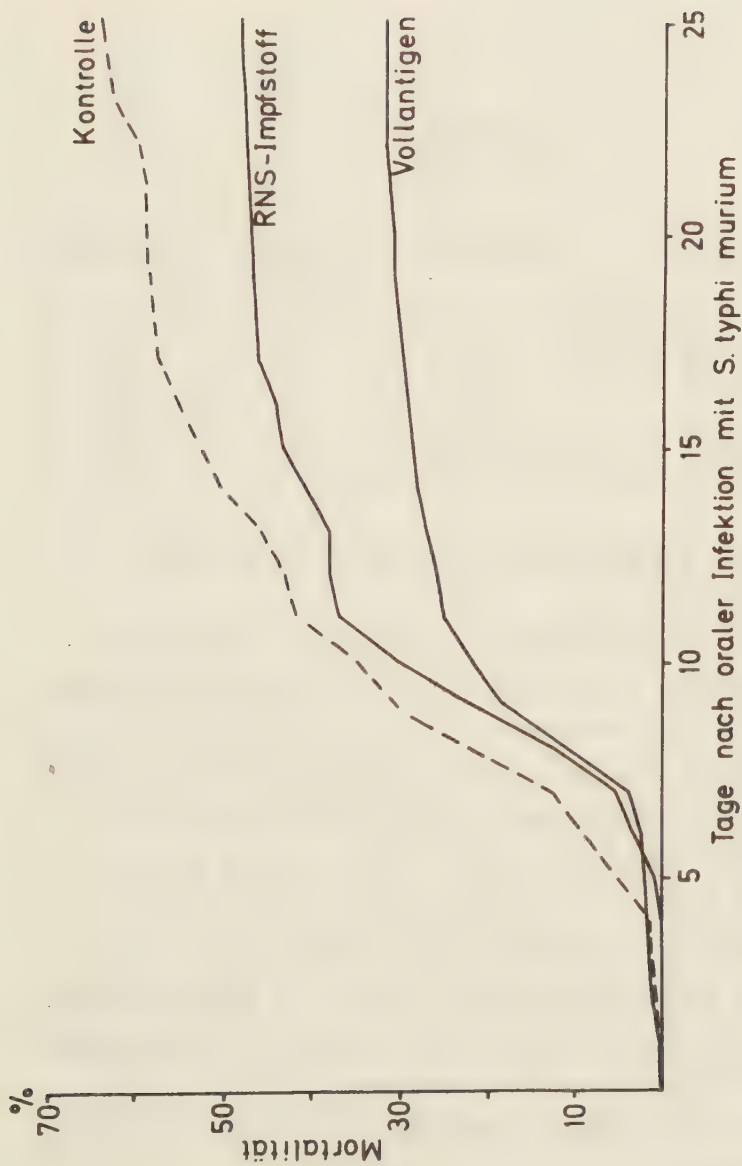


Abb. 1 Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit *S. typhi* murium bei 287 oral mit RNS immunisierten Mäusen, 297 spezifisch geimpften, positiven Kontrollen und 294 nichtgeimpften Kontrollmäusen.

Unterschied fest.

Tabelle 4
Vierfeldertafel.

	Gestorben	Infektion überstanden	Insgesamt
Mit Ribonucleinsäure immunisiert	140	147	287
Kontrolle	190	104	294
Insgesamt	330	251	581

3. Orale Immunisierung mit LPS aus S. typhi murium-
Bakterien

Das Ergebnis der 6 Versuche der 3. Gruppe ist in Tabelle 5 zusammengefaßt. In allen Versuchen ist die Mortalität gegenüber den Kontrollen gesenkt. Ein guter Impferfolg wurde in Versuch Nr. 4 erzielt, in dem die Mortalitätsdifferenz 34,3% betrug. Im 6. Versuch starben 58,2% von 48 geimpften und 82,9% von 47 ungeimpften Tieren. Dieser Versuch wies damit allgemein eine hohe Sterblichkeit auf. In Versuch Nr. 5 waren keine großen Unterschiede in der Mortalität zu verzeichnen; bei den Immuntieren erlagen 61,3% einer Infektion, bei den Kontrollen 66,0%. Zusammenfassend läßt sich erkennen, daß der Impfschutz von LPS, gemessen an der Endmortalität, mit etwa 15%iger Senkung gegenüber den Kontrollen ähnlich dem von RNS ist.

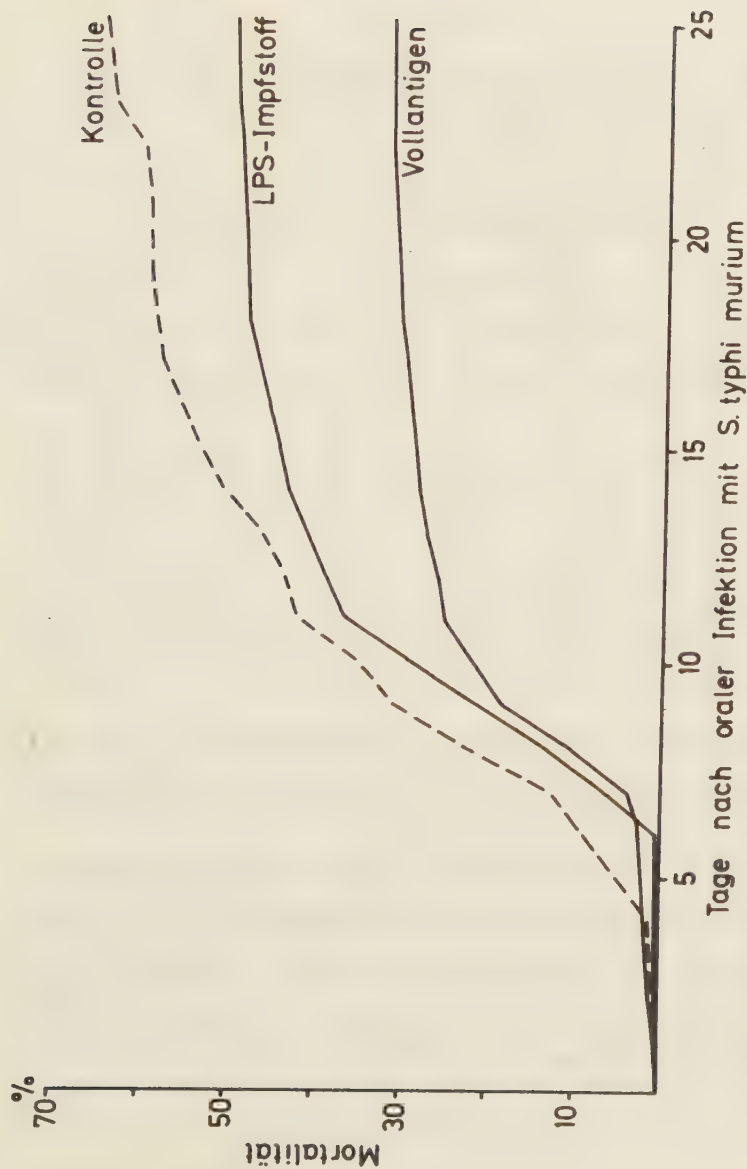


Abb. 2 Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit *S. typhi* murium bei 290 oral mit LPS immunisierten Mäusen, 297 spezifisch geimpften, positiven Kontrollen und 294 nicht-geimpften Kontrollmäusen.

Tabelle 5

Die Daten für die Versuche mit spezifischer, oraler Immunisierung durch LPS und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S.typhi murium*-Bakterien.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen		
	n	davon gestorben abs.	%	n	davon gestorben abs.	%
1	2	3	4	5	6	7
1	49	15	30,6	50	18	34,0
2	50	26	52,0	50	34	68,0
3	46	27	58,5	50	32	64,0
4	49	20	40,8	47	34	75,1
5	48	29	61,3	50	33	66,0
6	48	28	58,2	47	39	82,9
Summe	290	145	50,2	294	190	65,0

Dieses Ergebnis ist statistisch gesichert mit $P < 0,05\%$, also ebenfalls hochsignifikant. In Tabelle 6 ist die Vierfelder-tafel für diesen Versuch dargestellt.

In Abbildung 2 werden die Summenkurven einander gegenübergestellt. Sie zeigen einen steilen Anstieg bis zum 11. Tage post infectionem. Aus dem Abstand zwischen den Kurven der mit LPS immunisierten Tiere und der negativen Kontrolle ist der Impferfolg zu ersehen.

Tabelle 6
Vierfeldertafel.

	Gestorben	Infektion überstanden	Insgesamt
Mit Lipopolysaccharid immunisiert	145	145	290
Kontrolle	190	104	294
Insgesamt	335	249	584

4. Orale Impfung mit Lipid aus S.typhi murium-Bakterien

Tabelle 7 zeigt die Daten für die 4. Versuchsgruppe. In 5 von 6 Versuchen ist ein Impferfolg nachweisbar. Das beste Ergebnis wurde in Versuch Nr. 4 erzielt mit 46,0% bei den Immunisierungen gegenüber 75,1% bei den Kontrollen. In Versuch Nr. 2 und 3 ließ sich nur ein geringer Impfschutz feststellen. Im 1. Versuch war keine Wirkung zu erkennen. Das Gesamtergebnis zeigt trotzdem einen signifikanten Unterschied zwischen der geimpften Gruppe und den Kontrollen (mit $P < 2,5\%$), obwohl die Endmortalitäten 55,3% bei den immunisierten und 65,0% bei den nichtimmunisierten Tieren betragen. Der Vergleich dieser beiden Kollektive ist aus der Vierfeldertafel in Tabelle 8 zu ersehen.

In Abbildung 3 ist die Zusammenfassung der 6 Versuche graphisch dargestellt. Es ist eine Annäherung der Mortalitätskurve der mit Lipid geimpften Mäuse an die der negativen Kontrolle zu erkennen.

Tabelle 7

Die Daten für die Versuche mit spezifischer, oraler Immunisierung durch Lipid und oraler Infektionsbelastung mit virulenten *S. typhi murium*-Bakterien.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen		
	n	davon gestorben		n	davon gestorben	
		abs.	%		abs.	%
1	2	3	4	5	6	7
1	48	18	37,4	50	18	34,0
2	50	33	66,0	50	34	68,0
3	48	30	62,4	50	32	64,0
4	50	23	46,0	47	34	75,1
5	50	24	48,0	50	33	66,0
6	50	36	72,0	47	39	82,9
Summe	296	164	55,3	294	190	65,0

Tabelle 8

Vierfeldertafel.

	Gestorben	Infektion überstanden	Insgesamt
Mit Lipid immunisiert	164	132	296
Kontrolle	190	104	294
Insgesamt	354	236	590

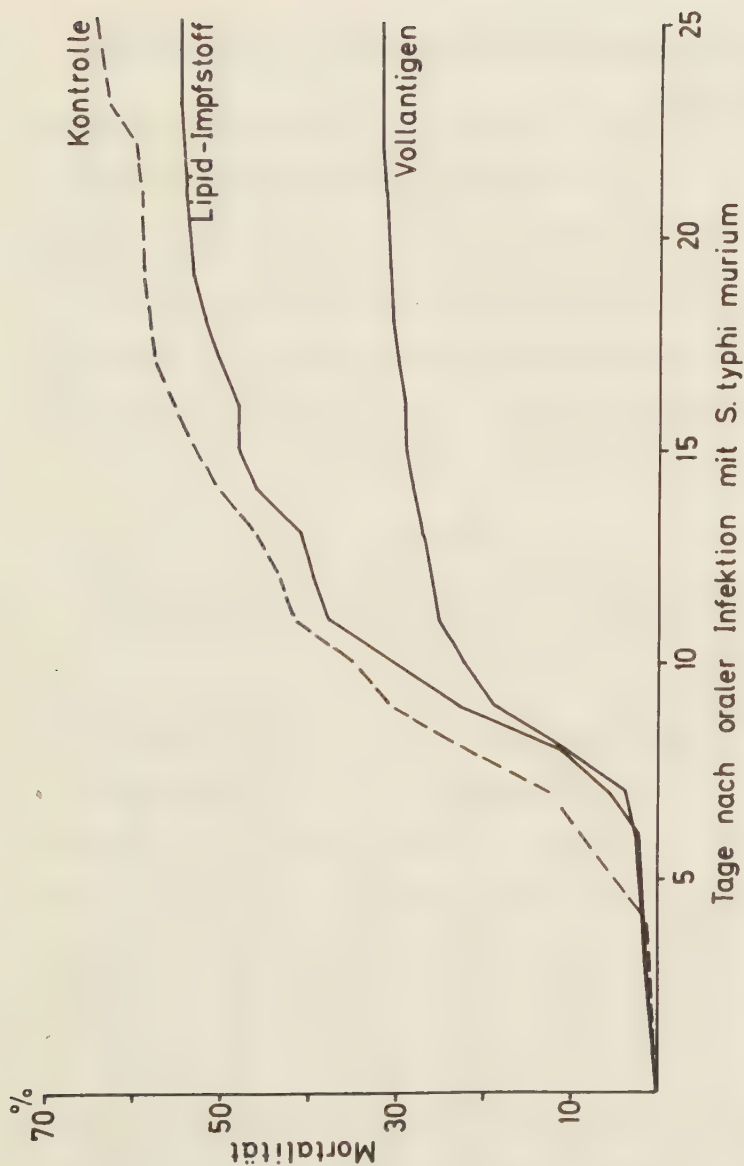


Abb. 3 Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit *S. typhi* murium bei 296 oral mit Lipid immunisierten Mäusen, 297 spezifisch geimpften, positiven Kontrollen und 294 nichtgeimpften Kontrollmäusen.

5. Orale Immunisierung mit Protein aus S.typhi murium- Bakterien

Die Ergebnisse der 5. Versuchsgruppe sind in Tabelle 9 zusammengestellt. In 4 von 6 Versuchen sind Mortalitätssenkungen zu verzeichnen. Ein guter Impferfolg wurde in Versuch Nr. 4 erzielt. Hier konnte die Sterblichkeit bei den Immuntieren um 31,1% gesenkt werden. In Versuch Nr. 2 und 3 konnte kein Schutz nach der spezifischen Impfung nachgewiesen werden. Bei der Zusammenfassung dieser 6 Versuche resultiert eine 9,5%ige Senkung der Mortalität durch die Immunisierung.

Tabelle 9

Die Daten für die Versuche mit spezifischer, oraler Immunisierung durch Protein und oraler Infektionsbelastung mit virulenten S.typhi murium-Bakterien.

Vers. Nr.	Spezifisch geimpfte Mäuse			Kontrollen		
	n	davon gestorben abs.	‰	n	davon gestorben abs.	‰
1	2	3	4	5	6	7
1	50	12	24,0	50	18	34,0
2	50	38	76,0	50	34	68,0
3	49	32	65,2	50	32	64,0
4	50	22	44,0	47	34	75,1
5	50	32	64,0	50	33	66,0
6	50	30	60,0	47	39	82,9
Summe	299	166	55,5	294	190	65,0

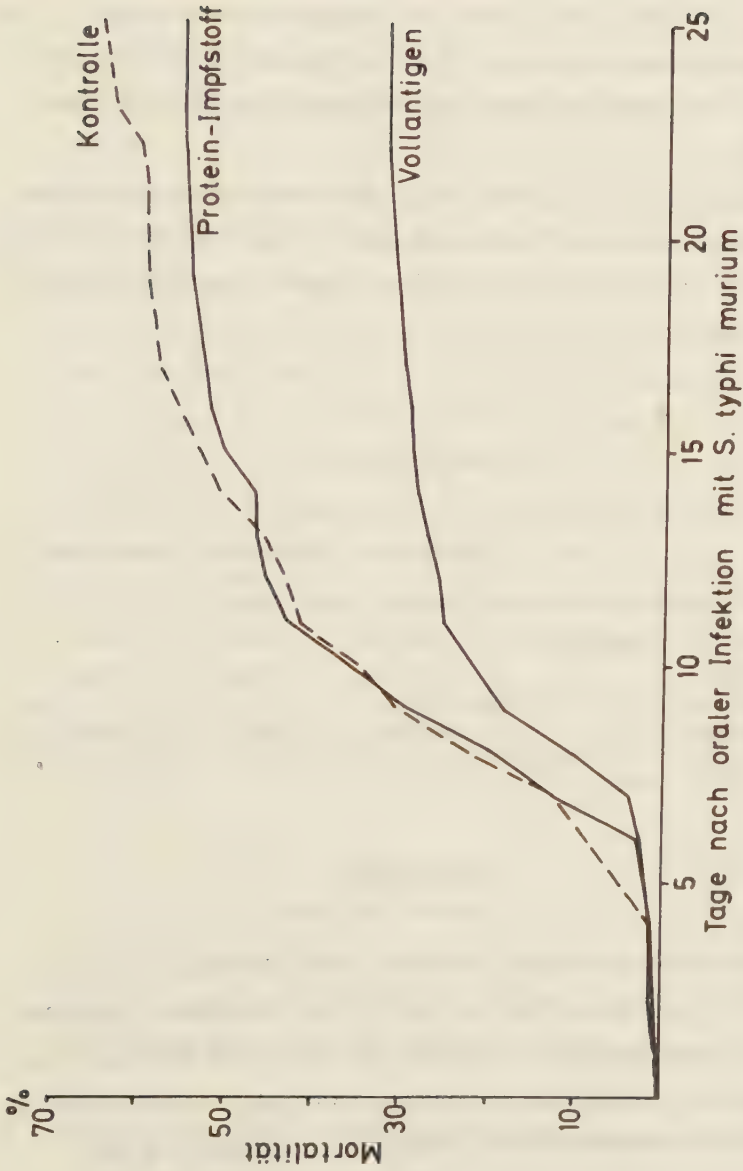


Abb. 4 Anstieg der Mortalität nach oraler Infektion mit *S. typhi murium* bei 299 oral mit Protein immunisierten Mäusen, 297 spezifisch geimpften, positiven Kontrollen und 294 nichtgeimpften Kontrollmäusen.

Nach dem Vierfelder- χ^2 -Test ist diese Differenz mit $P < 2,5\%$ statistisch gesichert. In der Vierfeldertafel (Tabelle 10) werden die geimpften Tiere mit der negativen Kontrolle verglichen.

Die Abbildung 4 zeigt die graphische Darstellung: die Mortalitätskurve der mit Protein geimpften Tiere verläuft zunächst nahe der der nichtgeimpften Mäuse, danach liegt sie deutlich unter ihr.

Tabelle 10
Vierfeldertafel.

	Gestorben	Infektion überstanden	Insgesamt
Mit Protein immunisiert	166	133	299
Kontrolle	190	104	294
Insgesamt	356	237	593

Diskussion

Die Tierversuche zeigen, daß eine orale Immunisierung mit Bakterienfraktionen möglich ist. Um die einzelnen Impfungen sowohl miteinander als auch mit den positiven und negativen Kontrollen vergleichen zu können, habe ich die Ergebnisse in Tabelle 11 zusammengefaßt. Außerdem berechnete ich den

Wirkungsindex, um eine Aussage über den Wert der Impfungen machen zu können. Er beträgt bei der positiven Kontrolle 50,2 und fällt in den übrigen Versuchsgruppen bis auf 14,6 ab. Der Impferfolg von RNS entspricht mit einem Wirkungsindex von 24,8 fast dem von LPS (22,8). Auch zwischen dem Lipid- und dem Protein-Impfstoff ist nur ein minimaler Unterschied in der Wirksamkeit einer spezifischen Immunisierung zu erkennen. Die statistische Sicherung führte ich mit Hilfe des χ^2 -Testes durch. Dabei stellte ich einen signifikanten Unterschied zwischen den Endmortalitäten der immunisierten Tiere und den Kontrollen fest. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt für RNS und LPS $P < 0,05\%$. In Tabelle 11 führte ich außerdem die Werte der Signifikanzberechnung nach KOLLER auf. Daraus ist zu ersehen, daß nur die Mortalitätsunterschiede zwischen den mit RNS als auch den mit LPS geimpften Tieren und den Kontrollen statistisch signifikant sind. Den höchsten Echtheitsgrad weist RNS auf mit $E = 1,35$. Der Immunisierungserfolg der Lipide und der Proteine ist dagegen nicht signifikant.

Dieses Ergebnis kann nicht mit anderen Angaben in bisher vorliegenden Veröffentlichungen verglichen werden, da die Fraktionen auf oralem Wege dem Makroorganismus zugeführt wurden und nicht, wie von den anderen Autoren beschrieben, auf intraperitonealem oder intravenösem Wege.

So erzielten O'DELL, WRIGHT und BIETER einen nichterregerspezifischen Immunisierungseffekt mit RNS aus Hefe (25).

Tabelle 11

Statistische Zusammenfassung der 6 Versuchsgruppen. Die Ergebnisse der oralen Immunisierungserfolge mit Bakterienfraktionen im Vergleich zu den spezifisch mit Vollantigen geimpften positiven Kontrollen und den nichtgeimpften Kontrollen.

Orale Impfung mit	Zahl der Mäuse	Endmortalität in %	Wirkungsindex	Beobachtete Differenz D_b	Größtmögliche Zufallsdifferenz D_z	Echtheit der Differenz $E=D_b:D_z$	Irrtumswahrscheinlichkeit im χ^2 -Test
1	2	3	4	5	6	7	8
Vollantigen	297	32,4	50,2	32,6	12,0	2,72	< 0,05%
RNS	287	48,9	24,8	16,1	12,3	1,35	< 0,05%
LPS	290	50,2	22,8	14,8	12,2	1,21	< 0,05%
Lipid	296	55,3	14,9	9,7	12,0	0,81	< 2,5%
Protein	299	55,5	14,6	9,5	12,0	0,79	< 2,5%
Keine	294	65,0	-	-	-	-	-

(Wirkungsindex = $\frac{(b-a)}{b} \times 100$, a = Endmortalität der geimpften Tiere, b = Endmortalität der nichtgeimpften Kontrollen. Die Werte in Spalte 6 sind den statistischen Tafeln von KOLLER (Darmstadt, Verlag Steinkopf 1969) entnommen).

Es gelang ihnen nach intraperitonealer Gabe von RNS, Mäuse vor einer Infektion durch das neurotrope MM-Virus zu schützen. HERRMANN berichtet über ähnliche Ergebnisse mit RNS aus *E. coli* und Hefe (15).

Andere Arbeitsgruppen beschreiben dagegen eine immunisierende Wirkung von LPS. GINSBERG, GOEBEL und HORSFALL konnten mit Polysacchariden aus *Bact. pneumoniae* Friedländer die Vermehrung von Myxoviren hemmen, die sie im Allantoissack von Hühnerembryonen angezüchtet hatten (10). ROWLEY beobachtete nach intravenöser Gabe von LPS aus *Bact. coli* 2380 eine Phase der erhöhten Empfänglichkeit, die etwa 24 - 48 Stunden anhielt. Anschließend kam es zu einer Immunität gegenüber einer Infektion mit *Bact. coli* 145, die ungefähr eine Woche dauerte (34). Ähnliche Versuchsergebnisse erhielten LANDY und PILLEMER (19), DUBOS und SCHAEGLER (6) und BOEHME und DUBOS (3).

Eine Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse zeigt, daß sowohl gute immunisierende Eigenschaften von RNS als auch von LPS beschrieben wurden.

Betrachtet man die Impferfolge von den Lipiden und Proteinen, so läßt sich nur ein geringer Schutz gegenüber einer Infektion feststellen. Dies stimmt mit den immunchemischen Versuchen von WESTPHAL und LÜDERITZ überein, die ergaben, daß die Proteine und Lipide keine endotoxischen Wirkungen haben (39).

Im folgenden soll die Frage behandelt werden, welche Faktoren die geringe Differenz der Versuchsergebnisse zwischen RNS und

LPS bewirkten. Bei der Prüfung der immunologischen Wirksamkeit von RNS-Präparaten an der Maus stellte HERRMANN fest, daß der Schutzeffekt verloren ging, wenn die RNS der Einwirkung von Ribonuclease unterworfen wurde. Um jegliche Verunreinigung mit Lipopolysacchariden auszuschalten, unterwarf er die Substanz einer Säurehydrolyse. LPS war dadurch neutralisierbar, dagegen war die immunisierende Eigenschaft der RNS nicht mehr nachweisbar (16).

Um für unsere Immunisierungsversuche chemisch reine Bakterienfraktionen herzustellen, wurden die Lipopolysaccharide von den Nucleinsäuren mit Hilfe der alkoholischen Fraktionierung nach GOEBEL, BINKLEY und PERLMAN getrennt (11). Die Reinheitsprüfungen ergaben einen RNS-Gehalt von nahezu 100%. Eine Verunreinigung mit LPS konnte mit Hilfe der spektrophotometrischen Messung und der Orcinbestimmung nicht nachgewiesen werden.

In den sechs Versuchsreihen, die insgesamt durchgeführt wurden, konnte nur dreimal ein besseres Ergebnis durch die RNS erzielt werden. In den übrigen Versuchen zeigte die LPS bessere Immunisierungserfolge. In der Zusammenfassung ließ sich erkennen, daß der Impfeffekt von RNS mit einer Endmortalität von 48,9% fast dem von LPS mit 50,2% entsprach.

Für die Erklärung dieses Ergebnisses könnte man drei Möglichkeiten in Betracht ziehen:

1. Die RNS löst unabhängig von anderen Substanzen eine Immunität aus.
2. LPS besitzt immunisierende Eigenschaften.

3. RNS ist mit Lipopolysaccharid verunreinigt. Der eigentliche Immunisierungseffekt ist auf LPS zurückzuführen. Zu dem ersten Punkt ist zu sagen, daß die RNS keine antigenen Wirkungen besitzt. Deshalb ist es auch wenig wahrscheinlich, daß sie allein einen immunisierenden Effekt bewirkt (13). Das Lipopolysaccharid gehört dagegen zu den stärksten Antigenen und ruft in Menschen und Tieren die Bildung von Antikörpern hervor (24, 39). Von verschiedenen Arbeitsgruppen (ROWLEY (34), LANDY und PILLEMER (19) und DUBOS und SCHAEGLER (6)) wurden Versuche zur Feststellung einer Infektoresistenz nach einer Immunisierung mit LPS durchgeführt und positive Ergebnisse bekanntgegeben. Unsere Untersuchungen weisen ähnliche Erfolge nach einer oralen Immunisierung mit LPS auf. Eine herabgesetzte Resistenz (negative Phase) innerhalb der ersten zwei Tage nach der Impfung, wie sie ROWLEY und DUBOS und SCHAEGLER feststellten, haben wir dagegen nicht geprüft, da die Tiere jeweils am 10. Tage nach der letzten oralen Immunisierung infiziert wurden. Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß das Lipopolysaccharid die Impferfolge hervorruft. Der Immunisierungsschutz durch die Ribonucleinsäure kann nur dadurch seine Erklärung finden, daß geringe Spuren von LPS daran beteiligt sind.

Unsere Versuche wurden mit erregerspezifischer LPS aus *S. typhi murium* durchgeführt. Die Infektion erfolgte mit dem virulenten Vollantigen. Aus dem Schrifttum geht hervor, daß LPS auch eine nichterregerspezifische Infektoresistenz hervor-

rufen kann. So gewannen DUBOS und SCHÄEDLER Lipopolysaccharide aus *S. typhi*. Mäuse wurden mit dieser Substanz auf intraperitonealem Wege immunisiert und anschließend mit Tuberkelbakterien infiziert. Je nach der Länge der Periode zwischen Impfung und Infektion resultierte eine negative Phase (kurze Periode) oder eine positive Phase; die Infektoresistenz nahm zu, wenn ein längerer Zeitraum zwischen Immunisierung und Infektion lag (6).

Diese unspezifische Wirkung von LPS wurde nicht nur in Tierversuchen beobachtet, sondern auch beim Menschen. LODINOVA und Mitarbeiter versuchten durch Gabe von LPS aus *S. typhi murium* an 13 - 15 Monate alte Säuglinge, den Widerstand gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien zu heben. Die ersten Erfolge, wie zum Beispiel die Aktivierung der Antikörperproduktion, erscheinen recht günstig (21).

In weiteren Tier- wie auch Feldversuchen sollte geklärt werden, inwieweit die unspezifische Wirkung des Lipopolysaccharids als prophylaktische wie auch therapeutische Maßnahme ausgenutzt werden könnte.

Zusammenfassung

Weiß Mäuse wurden mit Bakterienfraktionen (RNS, LPS, Lipid und Protein) aus *S. typhi murium* 10 Tage lang oral immunisiert und nach weiteren 10 Tagen mit dem virulenten *S. typhi murium*-Stamm oral infiziert.

Nach oraler Impfung mit RNS oder LPS war ein signifikanter

Schutzeffekt zu beobachten. Die Immunisierung mit dem Lipid- oder Protein-Präparat zeigte nach dem Vierfelder- χ^2 -Test einen geringeren, aber noch signifikanten Impferfolg. Die Signifikanzberechnung nach KOLLER ließ dagegen keine statistische Sicherung mehr zu.

Die Ergebnisse werden mit den Mitteilungen verschiedener Arbeitsgruppen verglichen und diskutiert.

Literatur

1. BESREDKA, A. Die lokale Immunisierung. Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1926
2. BILLAUDELLE, H. Die Agglutinogenität von Fraktionen aus Salmonella typhi. Ihre Beziehungen zu Pyrogenität, Toxizität und Immunogenität. Z. Immun.-föschg. 123, 382 (1962)
3. BOEHME, D. The Effect of Bacterial Constituents on the Resistance of Mice to Heterologous Infection and on the Activity of Their Reticulo-Endothelial System. J. exp. Med. 107, 523 (1958)
4. CREACH, O. Importance des lipides de l'antigène somatique dans la vaccination contre les salmonelloses. Rev. Cps. de Santé 7, 177 (1966)
5. DAVIES, D. A. L. Studies in Immunochemistry. 15. The Specific Polysaccharide of the Dominant 'O' Somatic Antigen of Shigella Dysenteriae. Biochem. J. 60, 290 (1955)
6. DUBOS, R. J. Reversible Changes in the Susceptibility of Mice to Bacterial Infections. J. exp. Med. 104, 53 (1956)
7. FELIX, A. A New Type of Typhoid and Paratyphoid Vaccine. Brit. med. J. 1, 391 (1941)
8. FIELD, T. E. Studies on the Rapid Production of a Non-Specific Type of Immunity to Salmo-
HOWARD, J. G.

- WHITBY, J. L. nella Typhi Infection in Mice. J. R. Army med. Cps. 101, 324 (1955)
9. FRATTINI, J. F. Consideraciones biofisicoquimicas sobre inmunizacion antitifica. Rev. Sanid. Milit. Argent. 53, 61 (1954)
10. GINSBERG, H. S. The Inhibitory Effect of Polysaccharide
GOEBEL, W. F. on Mumps Virus Multiplication. J. exp.
HORSFALL, F. L. Med. 87, 385 (1948)
11. GOEBEL, W. F. Studies on the Flexner Group of Dysen-
BINKLEY, F. tery Bacilli. J. exp. Med. 81, 315
PERLMAN, E. (1945)
12. GÜNTHER, O. Schutzimpfungen gegen bakterielle Darm-
infektionen. In: HERRLICH, A., Handbuch
der Schutzimpf. 542, Springer-Verlag,
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1965
13. HEIDELBERGER, M. Lectures in Immunochemistry. Academic
Press, New York 1956
14. HERRMANN, R. Immunologisches Verhalten von Nuclein-
säuren aus E. coli. I. Mitteilung: Ver-
suche über die Antigenität. Zbl. f.
Bakt. I. Orig. 179, 86 (1960)
15. ders. Immunologisches Verhalten von Nuclein-
säuren aus E. coli. II. Mitteilung:
Tierexperimentelle Untersuchungen. Zbl.
f. Bakt. I. Orig. 189, 380 (1963)
16. ders. Über die Antigenität der DNS und RNS aus
gramnegativen Bakterien. Zbl. f. Bakt.
I. Ref. 209, 429 (1967)

17. HERRMANN, R. Immunologische Aktivität von RNS und DNS aus gramnegativen Bakterien. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 208, 152 (1968)
18. KAUFFMANN, F. Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. I. Analyse der Zuckerbausteine von Salmonella-O-Antigenen. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 178, 442 (1960)
19. LANDY, M. Elevation of Properdin Levels in Mice Following Administration of Bacterial Lipopolysaccharides. J. exp. Med. 103, 823 (1956)
20. LANDY, M. Increased Resistance to Infection and Accompanying Alteration in Properdin Levels Following Administration of Bacterial Lipopolysaccharides. J. exp. Med. 104, 383 (1956)
21. LODINOVA, R. Influence of the Repeated Administration of Lipopolysaccharides of Salmonella Typhi Murium on Some Indicators of Immunity in Infants in Their First Year. Rev. Czech. Med. 9, 10 (1963)
22. LÜDERITZ, O. Die Bedeutung von Mutanten bei Enterobacteriaceen für die chemische Erforschung ihrer Zellwand-Polysaccharide. Angew. Chemie 78, 172 (1966)
23. MEJBAUM, W. Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chemie 258, 117 (1939)

24. MESROBEANU, L. Les antigènes glycido-lipidiques des bactéries. Masson & Cie, Paris 1936
25. O'DELL, T. B. Chemotherapeutic Activity of Nucleic
WRIGHT, H. N. Acids and High Protein Diets Against
BIETER, R. N. the Infection Caused by the MM Virus in
Mice. J. Pharmacol. 107, 232 (1953)
26. PAIMER, J. W. Scientific Apparatus and Laboratory Me-
GERLOUGH, T. D. thods. A Simple Method for Preparing
Antigenic Substances from the Typhoid
Bacillus. Science (N.Y.) 92, 155 (1940)
27. RAETTIG, H. Die lokale Immunisierung mit inaktivier-
tem Antigen gegen bakterielle Darmin-
fektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera,
Ruhr). Zbl.f.Bakt.I.Ref. 183, 1 (1962)
28. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermeh-
rungsfähigen Mikroorganismen oder ihren
Antigenen. I. Mitteilung: Der Grundver-
such zur Schutzimpfung der Maus gegen
eine Enteritis-Infektion. Zbl. f. Bakt.
I. Orig. 193, 398 (1964)
29. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermeh-
rungsfähigen Mikroorganismen oder ihren
Antigenen. 2. Mitteilung: Experimente
zur unspezifischen Schutzimpfung bei
der Enteritis-Infektion der Maus. Zbl.
f. Bakt. I. Orig. 197, 368 (1965)
30. ders. Aktive Immunisierung im Epidemiegebiet.
Ann. Immunol. Hung. 2, 197 (1966)
31. ders. Indikationen und Kontraindikationen bei

aktiven Schutzimpfungen. Der Internist
7, 2. Heft, 65 (1966)

32. RAETTIG, H. Empfehlenswerte Immunprophylaxe gegen
bakterielle Darmerkrankungen. Z. f.
ärztl. Fortb. 56, 7. Heft, 1967
33. ders. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Anti-
genen. 3. Mitteilung: Dosierung und
Impfrhythmus bei der spezifischen Imp-
fung der Maus gegen Salmonellen-Enteri-
tis. Zbl.f.Bakt.I.Orig. 203, 478 (1967)
34. ROWLEY, D. Rapidly Induced Changes in the Level of
Non-Specific Immunity in Laboratory Ani-
mals. Brit.J.exp.Path. 37, 223 (1956)
35. SACHS, L. Statistische Methoden und ihre Anwendung.
Springer-Verlag 1969
36. SCHUSTER, H. Die Struktur der Ribonucleinsäure aus
SCHRAMM, G. Tabakmosaikvirus. Z. f. Naturforschg.
ZILLIG, W. 11 b, 339 (1956)
37. WESTPHAL, O. Über die Extraktion von Bakterien mit
LÜDERITZ, O. Phenol/Wasser. Z. f. Naturforschg. 7 b,
BISTER, F. 148 (1952)
38. WESTPHAL, O. Über bakterielle Reizstoffe. I. Mittei-
LÜDERITZ, O. lung: Reindarstellung eines Polysaccha-
EICHENBERGER, E. rid-Pyrogens aus Bacterium coli. Z. f.
KEIDERLING, W. Naturforschg. 7 b, 536 (1952)
39. WESTPHAL, O. Chemische Erforschung von Lipopolysac-
LÜDERITZ, O. chariden gramnegativer Bakterien.

Angew. Chemie 66, 407 (1954)

40. WESTPHAL, O. Die Bedeutung der Lipoid-Komponente
NOWOTNY, A. (Lipoid A) für die biologischen Wir-
LÜDERITZ, O. kungen bakterieller Endotoxine (Lipo-
HURNI, H. polysaccharide). Pharmac. Acta Helv.
EICHENBERGER, E. 33, 401 (1958)
SCHÖNHOLZER, G.

Den Herren Prof. Dr. H. Raettig und Prof. Dr. R. Herrmann habe ich sehr zu danken für Rat und Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen. Besonderen Dank schulde ich auch Frau B. Ganze und Fräulein G. Schleusener für ihre Unterstützung bei der technischen Ausführung der Versuche. Frau K. Schmidt vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation danke ich für ihre Beratung.

Lebenslauf

Ich, Elke Rosa Birnschein, Tochter des Revisors Kurt Birnschein und seiner Ehefrau Edith, geborene Bogatzki, wurde am 10. Februar 1945 in Berlin geboren. Mein Vater ist seit August 1944 als Soldat vermißt.

Von 1951 bis 1965 besuchte ich zunächst die Grundschule und anschließend die Oberschule wissenschaftlichen Zweiges in Berlin. Im März 1965 erwarb ich die Hochschulreife.

Am 27. April 1965 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 15. März 1966, die ärztliche Vorprüfung am 2. Oktober 1967 und die ärztliche Prüfung am 11. Februar 1971.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Die Bedeutung der Arbeit 2
3. Die Aufgaben der Arbeit 3
4. Die Organisation der Arbeit 4
5. Die Durchführung der Arbeit 5
6. Die Ergebnisse der Arbeit 6
7. Die Zusammenfassung 7
8. Die Literatur 8
9. Die Anlagen 9
10. Die Tabellen 10
11. Die Abbildungen 11
12. Die Formeln 12
13. Die Diagramme 13
14. Die Zeichnungen 14
15. Die Berechnungen 15
16. Die Proben 16
17. Die Messungen 17
18. Die Versuche 18
19. Die Beobachtungen 19
20. Die Ergebnisse der Versuche 20
21. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 21
22. Die Literatur 22
23. Die Anlagen 23
24. Die Tabellen 24
25. Die Abbildungen 25
26. Die Formeln 26
27. Die Diagramme 27
28. Die Zeichnungen 28
29. Die Berechnungen 29
30. Die Proben 30
31. Die Messungen 31
32. Die Versuche 32
33. Die Beobachtungen 33
34. Die Ergebnisse der Versuche 34
35. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 35
36. Die Literatur 36
37. Die Anlagen 37
38. Die Tabellen 38
39. Die Abbildungen 39
40. Die Formeln 40
41. Die Diagramme 41
42. Die Zeichnungen 42
43. Die Berechnungen 43
44. Die Proben 44
45. Die Messungen 45
46. Die Versuche 46
47. Die Beobachtungen 47
48. Die Ergebnisse der Versuche 48
49. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 49
50. Die Literatur 50
51. Die Anlagen 51
52. Die Tabellen 52
53. Die Abbildungen 53
54. Die Formeln 54
55. Die Diagramme 55
56. Die Zeichnungen 56
57. Die Berechnungen 57
58. Die Proben 58
59. Die Messungen 59
60. Die Versuche 60
61. Die Beobachtungen 61
62. Die Ergebnisse der Versuche 62
63. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 63
64. Die Literatur 64
65. Die Anlagen 65
66. Die Tabellen 66
67. Die Abbildungen 67
68. Die Formeln 68
69. Die Diagramme 69
70. Die Zeichnungen 70
71. Die Berechnungen 71
72. Die Proben 72
73. Die Messungen 73
74. Die Versuche 74
75. Die Beobachtungen 75
76. Die Ergebnisse der Versuche 76
77. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 77
78. Die Literatur 78
79. Die Anlagen 79
80. Die Tabellen 80
81. Die Abbildungen 81
82. Die Formeln 82
83. Die Diagramme 83
84. Die Zeichnungen 84
85. Die Berechnungen 85
86. Die Proben 86
87. Die Messungen 87
88. Die Versuche 88
89. Die Beobachtungen 89
90. Die Ergebnisse der Versuche 90
91. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 91
92. Die Literatur 92
93. Die Anlagen 93
94. Die Tabellen 94
95. Die Abbildungen 95
96. Die Formeln 96
97. Die Diagramme 97
98. Die Zeichnungen 98
99. Die Berechnungen 99
100. Die Proben 100
101. Die Messungen 101
102. Die Versuche 102
103. Die Beobachtungen 103
104. Die Ergebnisse der Versuche 104
105. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 105
106. Die Literatur 106
107. Die Anlagen 107
108. Die Tabellen 108
109. Die Abbildungen 109
110. Die Formeln 110
111. Die Diagramme 111
112. Die Zeichnungen 112
113. Die Berechnungen 113
114. Die Proben 114
115. Die Messungen 115
116. Die Versuche 116
117. Die Beobachtungen 117
118. Die Ergebnisse der Versuche 118
119. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 119
120. Die Literatur 120
121. Die Anlagen 121
122. Die Tabellen 122
123. Die Abbildungen 123
124. Die Formeln 124
125. Die Diagramme 125
126. Die Zeichnungen 126
127. Die Berechnungen 127
128. Die Proben 128
129. Die Messungen 129
130. Die Versuche 130
131. Die Beobachtungen 131
132. Die Ergebnisse der Versuche 132
133. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 133
134. Die Literatur 134
135. Die Anlagen 135
136. Die Tabellen 136
137. Die Abbildungen 137
138. Die Formeln 138
139. Die Diagramme 139
140. Die Zeichnungen 140
141. Die Berechnungen 141
142. Die Proben 142
143. Die Messungen 143
144. Die Versuche 144
145. Die Beobachtungen 145
146. Die Ergebnisse der Versuche 146
147. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 147
148. Die Literatur 148
149. Die Anlagen 149
150. Die Tabellen 150
151. Die Abbildungen 151
152. Die Formeln 152
153. Die Diagramme 153
154. Die Zeichnungen 154
155. Die Berechnungen 155
156. Die Proben 156
157. Die Messungen 157
158. Die Versuche 158
159. Die Beobachtungen 159
160. Die Ergebnisse der Versuche 160
161. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 161
162. Die Literatur 162
163. Die Anlagen 163
164. Die Tabellen 164
165. Die Abbildungen 165
166. Die Formeln 166
167. Die Diagramme 167
168. Die Zeichnungen 168
169. Die Berechnungen 169
170. Die Proben 170
171. Die Messungen 171
172. Die Versuche 172
173. Die Beobachtungen 173
174. Die Ergebnisse der Versuche 174
175. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 175
176. Die Literatur 176
177. Die Anlagen 177
178. Die Tabellen 178
179. Die Abbildungen 179
180. Die Formeln 180
181. Die Diagramme 181
182. Die Zeichnungen 182
183. Die Berechnungen 183
184. Die Proben 184
185. Die Messungen 185
186. Die Versuche 186
187. Die Beobachtungen 187
188. Die Ergebnisse der Versuche 188
189. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 189
190. Die Literatur 190
191. Die Anlagen 191
192. Die Tabellen 192
193. Die Abbildungen 193
194. Die Formeln 194
195. Die Diagramme 195
196. Die Zeichnungen 196
197. Die Berechnungen 197
198. Die Proben 198
199. Die Messungen 199
200. Die Versuche 200
201. Die Beobachtungen 201
202. Die Ergebnisse der Versuche 202
203. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 203
204. Die Literatur 204
205. Die Anlagen 205
206. Die Tabellen 206
207. Die Abbildungen 207
208. Die Formeln 208
209. Die Diagramme 209
210. Die Zeichnungen 210
211. Die Berechnungen 211
212. Die Proben 212
213. Die Messungen 213
214. Die Versuche 214
215. Die Beobachtungen 215
216. Die Ergebnisse der Versuche 216
217. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 217
218. Die Literatur 218
219. Die Anlagen 219
220. Die Tabellen 220
221. Die Abbildungen 221
222. Die Formeln 222
223. Die Diagramme 223
224. Die Zeichnungen 224
225. Die Berechnungen 225
226. Die Proben 226
227. Die Messungen 227
228. Die Versuche 228
229. Die Beobachtungen 229
230. Die Ergebnisse der Versuche 230
231. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 231
232. Die Literatur 232
233. Die Anlagen 233
234. Die Tabellen 234
235. Die Abbildungen 235
236. Die Formeln 236
237. Die Diagramme 237
238. Die Zeichnungen 238
239. Die Berechnungen 239
240. Die Proben 240
241. Die Messungen 241
242. Die Versuche 242
243. Die Beobachtungen 243
244. Die Ergebnisse der Versuche 244
245. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 245
246. Die Literatur 246
247. Die Anlagen 247
248. Die Tabellen 248
249. Die Abbildungen 249
250. Die Formeln 250
251. Die Diagramme 251
252. Die Zeichnungen 252
253. Die Berechnungen 253
254. Die Proben 254
255. Die Messungen 255
256. Die Versuche 256
257. Die Beobachtungen 257
258. Die Ergebnisse der Versuche 258
259. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 259
260. Die Literatur 260
261. Die Anlagen 261
262. Die Tabellen 262
263. Die Abbildungen 263
264. Die Formeln 264
265. Die Diagramme 265
266. Die Zeichnungen 266
267. Die Berechnungen 267
268. Die Proben 268
269. Die Messungen 269
270. Die Versuche 270
271. Die Beobachtungen 271
272. Die Ergebnisse der Versuche 272
273. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 273
274. Die Literatur 274
275. Die Anlagen 275
276. Die Tabellen 276
277. Die Abbildungen 277
278. Die Formeln 278
279. Die Diagramme 279
280. Die Zeichnungen 280
281. Die Berechnungen 281
282. Die Proben 282
283. Die Messungen 283
284. Die Versuche 284
285. Die Beobachtungen 285
286. Die Ergebnisse der Versuche 286
287. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 287
288. Die Literatur 288
289. Die Anlagen 289
290. Die Tabellen 290
291. Die Abbildungen 291
292. Die Formeln 292
293. Die Diagramme 293
294. Die Zeichnungen 294
295. Die Berechnungen 295
296. Die Proben 296
297. Die Messungen 297
298. Die Versuche 298
299. Die Beobachtungen 299
300. Die Ergebnisse der Versuche 300
301. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 301
302. Die Literatur 302
303. Die Anlagen 303
304. Die Tabellen 304
305. Die Abbildungen 305
306. Die Formeln 306
307. Die Diagramme 307
308. Die Zeichnungen 308
309. Die Berechnungen 309
310. Die Proben 310
311. Die Messungen 311
312. Die Versuche 312
313. Die Beobachtungen 313
314. Die Ergebnisse der Versuche 314
315. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 315
316. Die Literatur 316
317. Die Anlagen 317
318. Die Tabellen 318
319. Die Abbildungen 319
320. Die Formeln 320
321. Die Diagramme 321
322. Die Zeichnungen 322
323. Die Berechnungen 323
324. Die Proben 324
325. Die Messungen 325
326. Die Versuche 326
327. Die Beobachtungen 327
328. Die Ergebnisse der Versuche 328
329. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 329
330. Die Literatur 330
331. Die Anlagen 331
332. Die Tabellen 332
333. Die Abbildungen 333
334. Die Formeln 334
335. Die Diagramme 335
336. Die Zeichnungen 336
337. Die Berechnungen 337
338. Die Proben 338
339. Die Messungen 339
340. Die Versuche 340
341. Die Beobachtungen 341
342. Die Ergebnisse der Versuche 342
343. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 343
344. Die Literatur 344
345. Die Anlagen 345
346. Die Tabellen 346
347. Die Abbildungen 347
348. Die Formeln 348
349. Die Diagramme 349
350. Die Zeichnungen 350
351. Die Berechnungen 351
352. Die Proben 352
353. Die Messungen 353
354. Die Versuche 354
355. Die Beobachtungen 355
356. Die Ergebnisse der Versuche 356
357. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 357
358. Die Literatur 358
359. Die Anlagen 359
360. Die Tabellen 360
361. Die Abbildungen 361
362. Die Formeln 362
363. Die Diagramme 363
364. Die Zeichnungen 364
365. Die Berechnungen 365
366. Die Proben 366
367. Die Messungen 367
368. Die Versuche 368
369. Die Beobachtungen 369
370. Die Ergebnisse der Versuche 370
371. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 371
372. Die Literatur 372
373. Die Anlagen 373
374. Die Tabellen 374
375. Die Abbildungen 375
376. Die Formeln 376
377. Die Diagramme 377
378. Die Zeichnungen 378
379. Die Berechnungen 379
380. Die Proben 380
381. Die Messungen 381
382. Die Versuche 382
383. Die Beobachtungen 383
384. Die Ergebnisse der Versuche 384
385. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 385
386. Die Literatur 386
387. Die Anlagen 387
388. Die Tabellen 388
389. Die Abbildungen 389
390. Die Formeln 390
391. Die Diagramme 391
392. Die Zeichnungen 392
393. Die Berechnungen 393
394. Die Proben 394
395. Die Messungen 395
396. Die Versuche 396
397. Die Beobachtungen 397
398. Die Ergebnisse der Versuche 398
399. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 399
400. Die Literatur 400
401. Die Anlagen 401
402. Die Tabellen 402
403. Die Abbildungen 403
404. Die Formeln 404
405. Die Diagramme 405
406. Die Zeichnungen 406
407. Die Berechnungen 407
408. Die Proben 408
409. Die Messungen 409
410. Die Versuche 410
411. Die Beobachtungen 411
412. Die Ergebnisse der Versuche 412
413. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 413
414. Die Literatur 414
415. Die Anlagen 415
416. Die Tabellen 416
417. Die Abbildungen 417
418. Die Formeln 418
419. Die Diagramme 419
420. Die Zeichnungen 420
421. Die Berechnungen 421
422. Die Proben 422
423. Die Messungen 423
424. Die Versuche 424
425. Die Beobachtungen 425
426. Die Ergebnisse der Versuche 426
427. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 427
428. Die Literatur 428
429. Die Anlagen 429
430. Die Tabellen 430
431. Die Abbildungen 431
432. Die Formeln 432
433. Die Diagramme 433
434. Die Zeichnungen 434
435. Die Berechnungen 435
436. Die Proben 436
437. Die Messungen 437
438. Die Versuche 438
439. Die Beobachtungen 439
440. Die Ergebnisse der Versuche 440
441. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 441
442. Die Literatur 442
443. Die Anlagen 443
444. Die Tabellen 444
445. Die Abbildungen 445
446. Die Formeln 446
447. Die Diagramme 447
448. Die Zeichnungen 448
449. Die Berechnungen 449
450. Die Proben 450
451. Die Messungen 451
452. Die Versuche 452
453. Die Beobachtungen 453
454. Die Ergebnisse der Versuche 454
455. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 455
456. Die Literatur 456
457. Die Anlagen 457
458. Die Tabellen 458
459. Die Abbildungen 459
460. Die Formeln 460
461. Die Diagramme 461
462. Die Zeichnungen 462
463. Die Berechnungen 463
464. Die Proben 464
465. Die Messungen 465
466. Die Versuche 466
467. Die Beobachtungen 467
468. Die Ergebnisse der Versuche 468
469. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 469
470. Die Literatur 470
471. Die Anlagen 471
472. Die Tabellen 472
473. Die Abbildungen 473
474. Die Formeln 474
475. Die Diagramme 475
476. Die Zeichnungen 476
477. Die Berechnungen 477
478. Die Proben 478
479. Die Messungen 479
480. Die Versuche 480
481. Die Beobachtungen 481
482. Die Ergebnisse der Versuche 482
483. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 483
484. Die Literatur 484
485. Die Anlagen 485
486. Die Tabellen 486
487. Die Abbildungen 487
488. Die Formeln 488
489. Die Diagramme 489
490. Die Zeichnungen 490
491. Die Berechnungen 491
492. Die Proben 492
493. Die Messungen 493
494. Die Versuche 494
495. Die Beobachtungen 495
496. Die Ergebnisse der Versuche 496
497. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 497
498. Die Literatur 498
499. Die Anlagen 499
500. Die Tabellen 500
501. Die Abbildungen 501
502. Die Formeln 502
503. Die Diagramme 503
504. Die Zeichnungen 504
505. Die Berechnungen 505
506. Die Proben 506
507. Die Messungen 507
508. Die Versuche 508
509. Die Beobachtungen 509
510. Die Ergebnisse der Versuche 510
511. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 511
512. Die Literatur 512
513. Die Anlagen 513
514. Die Tabellen 514
515. Die Abbildungen 515
516. Die Formeln 516
517. Die Diagramme 517
518. Die Zeichnungen 518
519. Die Berechnungen 519
520. Die Proben 520
521. Die Messungen 521
522. Die Versuche 522
523. Die Beobachtungen 523
524. Die Ergebnisse der Versuche 524
525. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 525
526. Die Literatur 526
527. Die Anlagen 527
528. Die Tabellen 528
529. Die Abbildungen 529
530. Die Formeln 530
531. Die Diagramme 531
532. Die Zeichnungen 532
533. Die Berechnungen 533
534. Die Proben 534
535. Die Messungen 535
536. Die Versuche 536
537. Die Beobachtungen 537
538. Die Ergebnisse der Versuche 538
539. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 539
540. Die Literatur 540
541. Die Anlagen 541
542. Die Tabellen 542
543. Die Abbildungen 543
544. Die Formeln 544
545. Die Diagramme 545
546. Die Zeichnungen 546
547. Die Berechnungen 547
548. Die Proben 548
549. Die Messungen 549
550. Die Versuche 550
551. Die Beobachtungen 551
552. Die Ergebnisse der Versuche 552
553. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 553
554. Die Literatur 554
555. Die Anlagen 555
556. Die Tabellen 556
557. Die Abbildungen 557
558. Die Formeln 558
559. Die Diagramme 559
560. Die Zeichnungen 560
561. Die Berechnungen 561
562. Die Proben 562
563. Die Messungen 563
564. Die Versuche 564
565. Die Beobachtungen 565
566. Die Ergebnisse der Versuche 566
567. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 567
568. Die Literatur 568
569. Die Anlagen 569
570. Die Tabellen 570
571. Die Abbildungen 571
572. Die Formeln 572
573. Die Diagramme 573
574. Die Zeichnungen 574
575. Die Berechnungen 575
576. Die Proben 576
577. Die Messungen 577
578. Die Versuche 578
579. Die Beobachtungen 579
580. Die Ergebnisse der Versuche 580
581. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 581
582. Die Literatur 582
583. Die Anlagen 583
584. Die Tabellen 584
585. Die Abbildungen 585
586. Die Formeln 586
587. Die Diagramme 587
588. Die Zeichnungen 588
589. Die Berechnungen 589
590. Die Proben 590
591. Die Messungen 591
592. Die Versuche 592
593. Die Beobachtungen 593
594. Die Ergebnisse der Versuche 594
595. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 595
596. Die Literatur 596
597. Die Anlagen 597
598. Die Tabellen 598
599. Die Abbildungen 599
600. Die Formeln 600
601. Die Diagramme 601
602. Die Zeichnungen 602
603. Die Berechnungen 603
604. Die Proben 604
605. Die Messungen 605
606. Die Versuche 606
607. Die Beobachtungen 607
608. Die Ergebnisse der Versuche 608
609. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 609
610. Die Literatur 610
611. Die Anlagen 611
612. Die Tabellen 612
613. Die Abbildungen 613
614. Die Formeln 614
615. Die Diagramme 615
616. Die Zeichnungen 616
617. Die Berechnungen 617
618. Die Proben 618
619. Die Messungen 619
620. Die Versuche 620
621. Die Beobachtungen 621
622. Die Ergebnisse der Versuche 622
623. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 623
624. Die Literatur 624
625. Die Anlagen 625
626. Die Tabellen 626
627. Die Abbildungen 627
628. Die Formeln 628
629. Die Diagramme 629
630. Die Zeichnungen 630
631. Die Berechnungen 631
632. Die Proben 632
633. Die Messungen 633
634. Die Versuche 634
635. Die Beobachtungen 635
636. Die Ergebnisse der Versuche 636
637. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 637
638. Die Literatur 638
639. Die Anlagen 639
640. Die Tabellen 640
641. Die Abbildungen 641
642. Die Formeln 642
643. Die Diagramme 643
644. Die Zeichnungen 644
645. Die Berechnungen 645
646. Die Proben 646
647. Die Messungen 647
648. Die Versuche 648
649. Die Beobachtungen 649
650. Die Ergebnisse der Versuche 650
651. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 651
652. Die Literatur 652
653. Die Anlagen 653
654. Die Tabellen 654
655. Die Abbildungen 655
656. Die Formeln 656
657. Die Diagramme 657
658. Die Zeichnungen 658
659. Die Berechnungen 659
660. Die Proben 660
661. Die Messungen 661
662. Die Versuche 662
663. Die Beobachtungen 663
664. Die Ergebnisse der Versuche 664
665. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 665
666. Die Literatur 666
667. Die Anlagen 667
668. Die Tabellen 668
669. Die Abbildungen 669
670. Die Formeln 670
671. Die Diagramme 671
672. Die Zeichnungen 672
673. Die Berechnungen 673
674. Die Proben 674
675. Die Messungen 675
676. Die Versuche 676
677. Die Beobachtungen 677
678. Die Ergebnisse der Versuche 678
679. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 679
680. Die Literatur 680
681. Die Anlagen 681
682. Die Tabellen 682
683. Die Abbildungen 683
684. Die Formeln 684
685. Die Diagramme 685
686. Die Zeichnungen 686
687. Die Berechnungen 687
688. Die Proben 688
689. Die Messungen 689
690. Die Versuche 690
691. Die Beobachtungen 691
692. Die Ergebnisse der Versuche 692
693. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 693
694. Die Literatur 694
695. Die Anlagen 695
696. Die Tabellen 696
697. Die Abbildungen 697
698. Die Formeln 698
699. Die Diagramme 699
700. Die Zeichnungen 700
701. Die Berechnungen 701
702. Die Proben 702
703. Die Messungen 703
704. Die Versuche 704
705. Die Beobachtungen 705
706. Die Ergebnisse der Versuche 706
707. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 707
708. Die Literatur 708
709. Die Anlagen 709
710. Die Tabellen 710
711. Die Abbildungen 711
712. Die Formeln 712
713. Die Diagramme 713
714. Die Zeichnungen 714
715. Die Berechnungen 715
716. Die Proben 716
717. Die Messungen 717
718. Die Versuche 718
719. Die Beobachtungen 719
720. Die Ergebnisse der Versuche 720
721. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 721
722. Die Literatur 722
723. Die Anlagen 723
724. Die Tabellen 724
725. Die Abbildungen 725
726. Die Formeln 726
727. Die Diagramme 727
728. Die Zeichnungen 728
729. Die Berechnungen 729
730. Die Proben 730
731. Die Messungen 731
732. Die Versuche 732
733. Die Beobachtungen 733
734. Die Ergebnisse der Versuche 734
735. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 735
736. Die Literatur 736
737. Die Anlagen 737
738. Die Tabellen 738
739. Die Abbildungen 739
740. Die Formeln 740
741. Die Diagramme 741
742. Die Zeichnungen 742
743. Die Berechnungen 743
744. Die Proben 744
745. Die Messungen 745
746. Die Versuche 746
747. Die Beobachtungen 747
748. Die Ergebnisse der Versuche 748
749. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 749
750. Die Literatur 750
751. Die Anlagen 751
752. Die Tabellen 752
753. Die Abbildungen 753
754. Die Formeln 754
755. Die Diagramme 755
756. Die Zeichnungen 756
757. Die Berechnungen 757
758. Die Proben 758
759. Die Messungen 759
760. Die Versuche 760
761. Die Beobachtungen 761
762. Die Ergebnisse der Versuche 762
763. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 763
764. Die Literatur 764
765. Die Anlagen 765
766. Die Tabellen 766
767. Die Abbildungen 767
768. Die Formeln 768
769. Die Diagramme 769
770. Die Zeichnungen 770
771. Die Berechnungen 771
772. Die Proben 772
773. Die Messungen 773
774. Die Versuche 774
775. Die Beobachtungen 775
776. Die Ergebnisse der Versuche 776
777. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 777
778. Die Literatur 778
779. Die Anlagen 779
780. Die Tabellen 780
781. Die Abbildungen 781
782. Die Formeln 782
783. Die Diagramme 783
784. Die Zeichnungen 784
785. Die Berechnungen 785
786. Die Proben 786
787. Die Messungen 787
788. Die Versuche 788
789. Die Beobachtungen 789
790. Die Ergebnisse der Versuche 790
791. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 791
792. Die Literatur 792
793. Die Anlagen 793
794. Die Tabellen 794
795. Die Abbildungen 795
796. Die Formeln 796
797. Die Diagramme 797
798. Die Zeichnungen 798
799. Die Berechnungen 799
800. Die Proben 800
801. Die Messungen 801
802. Die Versuche 802
803. Die Beobachtungen 803
804. Die Ergebnisse der Versuche 804
805. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 805
806. Die Literatur 806
807. Die Anlagen 807
808. Die Tabellen 808
809. Die Abbildungen 809
810. Die Formeln 810
811. Die Diagramme 811
812. Die Zeichnungen 812
813. Die Berechnungen 813
814. Die Proben 814
815. Die Messungen 815
816. Die Versuche 816
817. Die Beobachtungen 817
818. Die Ergebnisse der Versuche 818
819. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 819
820. Die Literatur 820
821. Die Anlagen 821
822. Die Tabellen 822
823. Die Abbildungen 823
824. Die Formeln 824
825. Die Diagramme 825
826. Die Zeichnungen 826
827. Die Berechnungen 827
828. Die Proben 828
829. Die Messungen 829
830. Die Versuche 830
831. Die Beobachtungen 831
832. Die Ergebnisse der Versuche 832
833. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 833
834. Die Literatur 834
835. Die Anlagen 835
836. Die Tabellen 836
837. Die Abbildungen 837
838. Die Formeln 838
839. Die Diagramme 839
840. Die Zeichnungen 840
841. Die Berechnungen 841
842. Die Proben 842
843. Die Messungen 843
844. Die Versuche 844
845. Die Beobachtungen 845
846. Die Ergebnisse der Versuche 846
847. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 847
848. Die Literatur 848
849. Die Anlagen 849
850. Die Tabellen 850
851. Die Abbildungen 851
852. Die Formeln 852
853. Die Diagramme 853
854. Die Zeichnungen 854
855. Die Berechnungen 855
856. Die Proben 856
857. Die Messungen 857
858. Die Versuche 858
859. Die Beobachtungen 859
860. Die Ergebnisse der Versuche 860
861. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 861
862. Die Literatur 862
863. Die Anlagen 863
864. Die Tabellen 864
865. Die Abbildungen 865
866. Die Formeln 866
867. Die Diagramme 867
868. Die Zeichnungen 868
869. Die Berechnungen 869
870. Die Proben 870
871. Die Messungen 871
872. Die Versuche 872
873. Die Beobachtungen 873
874. Die Ergebnisse der Versuche 874
875. Die Zusammenfassung der Ergebnisse 875
876. Die Literatur 876
877. Die Anlagen 877
87

